

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/005790

International filing date: 28 March 2005 (28.03.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-096877
Filing date: 29 March 2004 (29.03.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 20 May 2005 (20.05.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日 Date of Application: 2004年 3月29日

出願番号 Application Number: 特願2004-096877

パリ条約による外国への出願に用いる優先権の主張の基礎となる出願の国コードと出願番号

The country code and number of your priority application, to be used for filing abroad under the Paris Convention, is

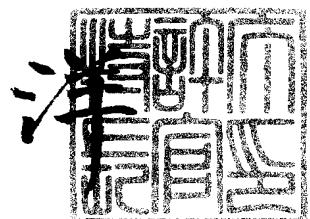
出願人 Applicant(s): 杉山 治夫

J P 2004-096877

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

2005年 4月27日

小川



【書類名】 特許願
【整理番号】 C1-A0402
【提出日】 平成16年 3月29日
【あて先】 特許庁長官殿
【発明者】
 【住所又は居所】 大阪府箕面市船場西 2-19-30
 【氏名】 杉山 治夫
【発明者】
 【住所又は居所】 大阪府吹田市豊津町 1-14-1004
 【氏名】 尾路 祐介
【特許出願人】
 【住所又は居所】 大阪府箕面市船場西 2-19-30
 【氏名又は名称】 杉山 治夫
【代理人】
 【識別番号】 100102978
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 清水 初志
【選任した代理人】
 【識別番号】 100108774
 【弁理士】
 【氏名又は名称】 橋本 一憲
【手数料の表示】
 【予納台帳番号】 041092
 【納付金額】 21,000円
【提出物件の目録】
 【物件名】 特許請求の範囲 1
 【物件名】 明細書 1
 【物件名】 図面 1
 【物件名】 要約書 1

【書類名】特許請求の範囲

【請求項 1】

以下の（a）から（c）のいずれかを有効成分として含有する、細胞増殖抑制剤。

（a）WT1遺伝子の転写産物に相補的な一本鎖RNA

（b）（a）のRNAをコードするDNA

（c）（b）のDNAが挿入されたベクター

【請求項 2】

一本鎖RNAが、WT1遺伝子の転写産物における配列番号：1に記載の塩基配列に相補的である、請求項1に記載の細胞増殖抑制剤。

【請求項 3】

一本鎖RNAが、配列番号：2に記載の塩基配列からなるRNAである、請求項1または2に記載の細胞増殖抑制剤

【書類名】明細書

【発明の名称】WT1遺伝子の発現を抑制するマイクロRNAおよびその利用

【技術分野】

【0001】

本発明は、WT1遺伝子の発現を抑制するマイクロRNAおよびその利用に関する。特に本発明は、該マイクロRNAを利用した細胞増殖の抑制に関する。

【背景技術】

【0002】

ウイルムス腫瘍遺伝子(WT1遺伝子)は、ジンクフィンガー型の転写因子をコードする遺伝子である。WT1は、WT1遺伝子に存在する2か所のalternative splicing部位のうちの5'側の部位に挿入された17個のアミノ酸(17AA)の有無とジンクフィンガー3'-4間の3アミノ酸残基の有無によって区別される、4つのアイソフォームの存在が知られている。

【0003】

ウイルムス腫瘍遺伝子(WT1遺伝子)は、小児腎腫瘍の原因遺伝子として単離された(非特許文献1、2)。ウイルムス腫瘍でこの遺伝子の欠損や突然変異が見つかったこと等から、従来は癌抑制遺伝子と考えられてきた。

【0004】

しかし、本発明者らによる数々の報告は、WT1遺伝子は癌抑制遺伝子というより、むしろ癌遺伝子様の機能を果たしていることを示唆している。変異のない野生型WT1遺伝子がほとんどすべての白血病細胞で高発現され、その発現レベルは白血病患者の予後と逆相関を示すこと(非特許文献3、4)、WT1アンチセンスDNAにより白血病細胞の増殖が特異的に抑制されること(非特許文献5)、マウス正常骨髄系前駆細胞および骨髄系前駆細胞株32D C13はWT1遺伝子の強制発現により好中球への分化が抑制され、増殖するようになること(非特許文献6)、等が明らかとなった。これらの知見は、WT1遺伝子は、造血系細胞の白血病化に関与していることを示すものである。また本発明者らは、野生型WT1遺伝子が種々の固形癌においても高発現していることを報告してきた(非特許文献7-14)。

【0005】

そこで本発明者らは、WT1遺伝子の発現を効率よく抑制することができれば、腫瘍特異的分子標的療法の開発につながると考えた。これまでに、WT1を標的とした腫瘍特異的分子標的療法の例は知られていない。

【0006】

【非特許文献1】Call KM, et al : Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. Cell 60 : 509, 1990

【非特許文献2】Gessler M, et al : Homozygous deletion in Wilms tumours of a zinc-finger gene identified by chromosome jumping. Nature 343 : 774, 1990

【非特許文献3】Inoue K, et al : WT1 as a new prognostic factor and a new marker for the detection of minimal residual disease in acute leukemia. Blood 84 : 3071, 1994

【非特許文献4】Inoue K, et al : Aberrant overexpression of the Wilms tumor gene (WT1) in human leukemia. Blood 89 : 1405, 1997

【非特許文献5】Yamagami T, Sugiyama H, Inoue K, Ogawa H, Tatekawa T, Hirata M, Kudoh T, Akiyama T, Murakami A, Maekawa T. Growth inhibition of human leukemic cells by WT1 (Wilms tumor gene) antisense oligodeoxynucleotides: implications for the involvement of WT1 in leukemogenesis. Blood. 1996 Apr 1;87(7):2878-84.

【非特許文献6】Inoue K, et al: Wilms' tumor gene (WT1) competes with differentiation-inducing signal in hematopoietic progenitor cells. Blood 91: 2969, 1998

【非特許文献7】Oji, Y., Ogawa, H., Tamaki, H., Oka, Y., Tsuboi, A., Kim, E.

H., Soma, T., Tatekawa, T., Kawakami, M., Asada, M., Kishimoto, T., and Sugiyama, H. Expression of the Wilms' tumor gene WT1 in solid tumors and its involvement in tumor cell growth. Japanese Journal of Cancer Research, 90: 194-204, 1999.

【非特許文献8】 Oji, Y., Miyoshi, S., Maeda, H., Hayashi, S., Tamaki, H., Nakatsuka, S., Yao, M., Takahashi, E., Nakano, Y., Hirabayashi, H., Shintani, Y., Oka, Y., Tsuboi, A., Hosen, N., Asada, M., Fujioka, T., Murakami, M., Kanato, K., Motomura, M., Kim, E.H., Kawakami, M., Ikegami, K., Ogawa, H., Aozasa, K., Kawase, I., and Sugiyama, H. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in de novo lung cancers. International Journal of Cancer, 100: 304-308, 2002.

【非特許文献9】 Ueda, T., Oji, Y., Naka, N., Nakano, Y., Takahashi, E., Koga, S., Asada, M., Ikeba, A., Nakatsuka, S., Abeno, S., Hosen, N., Tomita, Y., Aozasa, K., Tamai, N., Myoui, A., Yoshikawa, H., and Sugiyama, H. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in human bone and soft-tissue sarcomas. Cancer Science, 94: 271-276, 2003.

【非特許文献10】 Oji, Y., Inohara, H., Nakazawa, M., Nakano, Y., Akahani, S., Nakatsuka, S., Koga, S., Abeno, S., Honjo, Y., Yamamoto, Y., Iwai, S., Yoshida, K., Oka, Y., Ogawa, H., Yoshida, J., Aozasa, K., Kubo, T., and Sugiyama, H. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in head and neck squamous cell carcinoma. Cancer Science, 94: 523-529, 2003.

【非特許文献11】 Oji, Y., Miyoshi, Y., Koga, S., Nakano, Y., Ando, A., Nakatsuka, S., Ikeba, A., Takahashi, E., Sakaguchi, N., Yokota, A., Hosen, N., Ikegami, K., Kawakami, M., Tsuboi, A., Oka, Y., Ogawa, H., Aozasa, K., Noguchi, S., and Sugiyama, H. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in primary thyroid cancer. Cancer Science, 94: 606-611, 2003.

【非特許文献12】 Oji, Y., Yamamoto, H., Nomura, M., Nakano, Y., Ikeba, A., Nakatsuka, S., Abeno, S., Kiyoto, E., Jomgeow, T., Sekimoto, M., Nezu, R., Yoshikawa, Y., Inoue, Y., Hosen, N., Kawakami, M., Tsuboi, A., Oka, Y., Ogawa, H., Souda, S., Aozasa, K., Monden, M., and Sugiyama, H. Overexpression of the Wilms' tumor gene WT1 in colorectal adenocarcinoma. Cancer Science, 94: 712-717, 2003.

【非特許文献13】 Oji, Y., Miyoshi, S., Takahashi, E., Koga, S., Nakano, Y., Shintani, Y., Hirabayashi, H., Matsumura, A., Iuchi, K., Ito, K., Kishimoto, Y., Tsuboi, A., Ikegami, K., Hosen, N., Oka, Y., Ogawa, H., Maeda, H., Hayashi, S., Kawase, I., and Sugiyama, H. Absence of mutations in the Wilms' tumor gene WT1 in de novo non-small cell lung cancers. Neoplasma, 51:17-20, 2004.

【非特許文献14】 Oji, Y., Miyoshi, Y., Kiyoto, E., Koga, S., Nakano, Y., Ando, A., Hosen, N., Tsuboi, A., Kawakami, M., Ikegami, K., Oka, Y., Ogawa, H., Noguchi, S., and Sugiyama, H. Absence of mutations in the Wilms' tumor gene WT1 in primary breast cancer. Jpn J Clin Oncol, in press.

【非特許文献15】 実験医学 Vol. 22 No. 4 (3月号) 494-499, 2004

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本発明は、WT1遺伝子の発現を効率的に抑制することができる分子を提供すると共に、該分子を利用して細胞増殖を抑制することを課題とする。WT1遺伝子の発現を抑制する分子として、特に本発明は、マイクロRNAを提供する。

【課題を解決するための手段】

【0008】

本発明者らは、上記課題を解決すべく、マイクロRNAを癌細胞に作用させてWT1の発現を抑制することを考えた。WT1 mRNAの配列に対しマイクロRNAとして働きうる可能性のあるマイクロRNAをデータベースから検索し、候補としてmicroRNA (miR) 115を選択した。マイクロRNAは、標的mRNAと不完全にしか結合しないため、標的を同定することは現在の技術状況下において容易ではない（非特許文献15）。しかし、鋭意努力の結果、本発明者らはWT1遺伝子を標的とするマイクロRNAがWT1遺伝子の発現を抑制するのみならず、顕著に癌細胞株の細胞増殖抑制効果を示すを見出した。すなわち、本発明はWT1を標的とするマイクロRNAによる細胞増殖抑制に関し、より具体的には、下記の発明を提供するものである。

【1】以下の(a)から(c)のいずれかを有効成分として含有する、細胞増殖抑制剤

(a) WT1遺伝子の転写産物に相補的な一本鎖RNA

(b) (a)のRNAをコードするDNA

(c) (b)のDNAが挿入されたベクター

【2】一本鎖RNAが、WT1遺伝子の転写産物における配列番号：1に記載の塩基配列に相補的である、【1】に記載の細胞増殖抑制剤

【3】一本鎖RNAが、配列番号：2に記載の塩基配列からなるRNAである、【1】または【2】に記載の細胞増殖抑制剤

【発明の効果】

【0009】

本発明によって、WT1遺伝子の発現を効率的に抑制することができるマイクロRNAおよび該マイクロRNAを有効成分とする細胞増殖抑制剤が提供された。WT1遺伝子は、癌細胞に高発現することが知られていることから、本発明の細胞増殖抑制剤は、新規抗癌剤として特に有用である。

【発明を実施するための最良の形態】

【0010】

本発明は、WT1遺伝子転写産物に結合するマイクロRNAに関する。一般的にマイクロRNAは、小さなnon-coding RNAで、mRNA配列に作用して遺伝子サイレンシングを引き起こすRNAとして捉えられている。マイクロRNA (miRNA) は、1993年Ambrosらのグループによって最初に報告された。Ambrosらは、線虫のlin-4というNon-coding RNAがlin-14あるいはlin-28という遺伝子の発現を、3'-UTR領域に結合することにより、翻訳段階で抑制することを報告した。その後、線虫のmiRNAとして21塩基からなるlet-7が報告された。let-7に関する研究からは、一種類のmiRNAが複数の標的mRNAを制御している可能性があることが示唆されている。現在ではmiRNAが動植物に広く分布していることがわかっており、300種類以上が報告されている。

【0011】

miRNAの発現過程と機能は以下のように考えられている。miRNAをコードする遺伝子から、数十から数百塩基の前駆体RNAが転写される。前駆体RNAは、核内でリボヌクレアーゼによってpre-miRNAと呼ばれるステムループ型RNAにプロセシングされる。pre-miRNAは輸送タンパク質と複合体を形成して核外に輸送された後、Dicerによってプロセンシングされ、成熟した機能性のmiRNAとなる。成熟したmiRNAはタンパク質複合体miRNPに取り込まれる。このmiRNP複合体が部分的に相補性を有する標的mRNAと結合して翻訳抑制に働くと考えられている。またmiRNAの中には、特定のmRNA配列と完全な相補性を持ち、siRNAとして機能するmiRNAが存在することが報告されている。通常のmiRNAが翻訳阻害により遺伝子発現を抑制するのに対し、このmiRNAはsiRNAと同様に標的mRNA配列を配列特異的切断によって遺伝子発現を抑制すると考えられている。

【0012】

本発明のマイクロRNAは、標的であるWT1遺伝子の転写産物と相補的な一本鎖RNAである。本発明における相補的とは、必ずしも完全に相補的であることを意味しない。本発明のマイクロRNAと標的であるWT1遺伝子の転写産物との結合において、ミスマッチ（対応する

塩基が相補的でない）、バルジ（一方の鎖に対応する塩基がない）などにより不対合部分が含まれていてもよい（図1参照）。

【0013】

本発明のマイクロRNAの標的となるWT1遺伝子の転写産物の配列は、マイクロRNAが結合することにより遺伝子発現抑制効果を示しうる限り、特に制限はない。標的配列の好ましい一例としては、配列番号：1の配列を挙げることができる。配列番号：1の配列は、ストップコドン直前の部位で、WT1遺伝子4種のアイソフォームに共通である。WT1遺伝子のアイソフォームの一つを配列番号：3に示した。配列番号：1の標的配列は、配列番号：3に示したWT1遺伝子配列中では第1723位から第1739位に存在し、ストップコドンは第1738位から第1740位に存在する。なお、開始コドンは第391位から第393位に存在する。

【0014】

本実施例においては、配列番号：1に記載の塩基配列を標的とするマイクロRNAとしてmiR-115を用いた。miR-115の塩基配列を、配列番号：2に示す。miR-115は、Dreyfussらによって、構成タンパク質eIF2C, Gemin3, Gemin4、と共にタンパク質複合体miRNP(ribonucleoprotein)を形成するマイクロRNAの一つとして同定された。Gemin3, Gemin4は、Gemin2, Gemin5と共に脊髄性筋萎縮症の原因タンパク質Survival of Motor Neuron (SMN)とSMN複合体を形成することが知られている。NCBI GenBankでのmiR-115の番号はAF480513である。

【0015】

本発明のマイクロRNAは、WT1遺伝子の発現を抑制する効果を有する限り、その長さを問わないと、好ましくは25塩基以下である。より好ましくは14-18塩基、最も好ましくは16塩基である。

【0016】

本発明のmiRNAから3'-UTR領域に存在する配列の塩基配列を基に標的となる配列を選択し、調製することができる。

本発明のmiRNAは、WT1遺伝子の転写産物の塩基配列を基に標的となる配列を選択し、化学的合成方法等によって、適宜調製することができる。

【0017】

本発明のmiRNAは、そのまま生体に投与することもできる。また、miRNAをコードするDNAを生体内に投与して、生体内でmiRNAを発現させることもできる。生体内でmiRNAを発現させる場合には、例えば、レトロウイルス、アデノウイルス、センダイウイルスなどのウイルスベクターやリポソームなどの非ウイルスベクターを利用することができる。投与方法としては、例えばin vivo法およびex vivo法を挙げることができる。

【0018】

本発明のmiRNA、該miRNAをコードするDNA、該DNAが挿入されたベクターは、適宜配合剤と混合して細胞増殖抑制剤として使用することができる。該細胞増殖抑制剤を公知トランسفエクション試薬等を用いて細胞に導入すれば、WT1転写物の翻訳阻害、またはWT1転写物の切断によって細胞増殖が抑制される。本発明による細胞増殖抑制剤の効果が期待される細胞は、WT1遺伝子を発現する細胞である。癌細胞にはWT1遺伝子が高発現している。WT1が高発現する癌細胞の例として、具体的には、ヒトの白血病、大腸癌、肺癌、乳癌、頭頸部扁平上皮癌、食道癌、胃癌、甲状腺癌、骨および軟部肉腫、卵巣癌、子宫癌、腎癌を例示することができる。一方、正常細胞にはWT1はごくわずかしか発現しない。したがって、本発明による細胞増殖抑制剤は、学術研究用としてのみならず、ヒトおよびその他の哺乳動物の癌治療用医薬品、特に上記に列挙した癌を対象とする癌治療用医薬品として有効と考えられる。本発明の癌治療用医薬品は、癌細胞に特異的に働き、正常細胞の損傷が少ない医薬品として有効と考えられる。

【0019】

本発明の細胞増殖抑制剤の調製においては、薬学上許容される配合剤を混合することができる。薬学上許容される配合剤として、例えば界面活性剤、賦形剤、着色料、着香料、保存料、安定剤、緩衝剤、懸濁剤、等張化剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、流動性促進剤、矯味剤等が挙げられるが、これらに制限されず、その他常用の担体を適宜使用することが

できる。上記製剤の剤型の種類としては、例えば経口剤として錠剤、粉末剤、丸剤、散剤、顆粒剤、細粒剤、軟・硬カプセル剤、フィルムコーティング剤、ペレット剤、舌下剤、ペースト剤等、非経口剤として注射剤、坐剤、経皮剤、軟膏剤、硬膏剤、外用液剤等が挙げられ、当業者においては投与経路や投与対象等に応じた最適の剤型を選ぶことができる。

【実施例】

【0020】

以下、本発明を実施例に基づきより具体的に説明する。もっとも、本発明は下記実施例に限定されるものではない。

【0021】

【実施例1】 microRNAの選択

WT1 mRNAのstop codon直前から3'UTRの配列に対しmicroRNAとして働きうる可能性のあるmicroRNAをデータベース（NCBI GenBank）から検索し、候補としてmicroRNA (miR) 115を選択した。

【0022】

【実施例2】 microRNAの調製

RNAを日本バイオサービスに依頼し合成した。これを $100\mu M$ の濃度でRNase free waterに溶解して分注し、使用するまで-80°Cで凍結保存した。合成したRNAの配列を以下に記す。
mir-115: 5' - uga agc gga gcu gga a-3' (配列番号: 2)

Luciferase AS 5' - ucg aag uau ucc gcg uac guu -3' (配列番号: 4)。

【0023】

【実施例3】 miR-115によるAZ-521細胞の増殖抑制

WT1遺伝子を高発現するgastric cancer cell line AZ-521細胞を10%含Dulbecco's Modified Medium (DMEM) 中で培養した。microRNAによる細胞の処理は、トリプシナイズしたAZ-521細胞を 1.2×10^5 cells · 2mlを6 well plateにまき24時間後にRNA(final conc. 2 μM)をRNAi Fect (QIAGEN) を用いて細胞に導入した。細胞数はトリプシナイズした後、算定板を用いて算定した。

【0024】

AZ-521細胞をmiR-115 (final conc. 2 μM)で処理すると、コントロールのRNAで処理したときに比べ有意にAZ-521細胞の増殖を抑制した(図2)。次にmiR-115の濃度を0.5, 1.0および2.0 μM に変え48時間処理し、miR-115の細胞増殖抑制効果を解析したところ、この効果はmiR-115の濃度に依存していた(図3)。

【0025】

【実施例4】 miR-115によるWT1タンパクの発現抑制

上記実施例3と同様に培養、トリプシナイズしたAZ-521を 1.2×10^5 cells / 2mlに調製後6 well plateにまき、24時間後にRNAi Fect (QIAGEN) 存在下でmiR-115またはLuciferase AS (濃度2 μM)で12時間処理した。

【0026】

これらの細胞におけるWT1タンパクの発現をWestern Blotで解析した。細胞をトリプシナイズしPBSにて2回洗浄後、 10^6 cells / $100\mu l$ の割合でLaemmeli's SDS sample bufferに溶解した。タンパクをSDS-PAGEにより分離した後PVDF膜に転写、1% gelatin/TBSTでプロッキングした。これを1次抗体anti WT1 C-19 Ab (Santa Cruz Biotechnology 100:1希釈)またはanti GAPDH Ab (1000:1)と反応させた後、それぞれに対するALP標識2次抗体を反応させBCIP/NBT kit (ナカライトスク)を用いてWT1及びGAPDHタンパクを検出した。

結果を図4に示す。miR-115処理により細胞内でのタンパクの発現が効率よく抑制されていた。

【0027】

【実施例5】 WT1の強制発現によるmiR-115の効果の抑制

miR-115がWT1特異的にAZ-521細胞の増殖を抑制しているかどうかを確認するため、WT1を強制発現させたAZ-521細胞をmiR-115で処理し、WT1発現抑制効果を検討した。

強制発現用として、CMVプロモーターを持つ発現ベクターpcDNA3.1 (Invitrogen) にWT1 17AA (+) KTS (+) を挿入したベクターpcDNAWT1A (+/+)を作製した。AZ-521細胞への導入はvector 2 μ gをFugene6 (Roche)を用いてLipofectionした。

【0028】

AZ-521細胞をまき、24時間後にRNA（終濃度2 μ M）をRNAiFect (QIAGEN)を用いて細胞に導入した。24時間後にpcDNA3.1/WTA (+/+)またはempty vector 2 μ gをLipofectionし72時間後にそれぞれの細胞を回収し算定した。細胞数はトリプシナイズした後、算定板を用いて算定した。

【0029】

pcDNA3.1/WTA (+/+)を導入した細胞においてempty vectorを導入した細胞に比較して有意にmiR-115の細胞増殖抑制効果が抑制されていた（図5）。これらの結果はmiR-115が特異的にWT1タンパクの発現を抑制することによりAZ-521細胞の増殖を抑制していることを示す。

【図面の簡単な説明】

【0030】

【図1】ヒトmiR-115（配列番号：2）とWT1 mRNAにおけるその標的領域（配列番号：1）との相補性を示す図である。

【図2】miR-115によるAZ-521細胞に対する増殖抑制効果の経時的变化を示す図である。

【図3】miR-115によるAZ-521細胞に対する増殖抑制効果の濃度依存性を示す図である。

【図4】miR-115によるWT1タンパク質発現抑制を示す写真である。

【図5】WT1の強制発現によりmiR-115のAZ-521細胞に対する増殖抑制効果がブロックされたことを示す図である。

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> SUGIYAMA, HARUO

<120> MICRO RNAs TARGETING WT1 AND USES THEREOF

<130> C1-A0402

<160> 4

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 17

<212> RNA

<213> Homo sapiens

<400> 1

cuccagcugg cggcuuug 17

<210> 2

<211> 16

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> An artificially synthesized RNA

<400> 2

ugaaggcgagg cuggaa 16

<210> 3

<211> 3030

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 3

gggttaagg a gttcaaggca ggcgcacac ccgggggctc tccgcaaccc gaccgcctgt 60

ccgctcccc acttccccgcc ctccctccca cctactcatt cacccaccca cccacccaga 120

gcgggacgg cagcccaggc gcccgggccc cgccgtctcc tcgcccggat cctggacttc 180

ctcttgctgc aggacccggc ttccacgtgt gtcccgagc cggcggtctca gcacacgctc 240

cgtccgggc ctgggtgcct acagcagcca gagcagcagg gagtcggga cccggggcggc 300

atctgggc a gtttaggcgc cgccgaggcc agcgctgaac gtctccaggg ccggaggagc 360
cgccccgtt cccgggtctga gccgcagcaa atgggctccg acgtgcggga cctgaacgcg 420
ctgctgcccg ccgtcccctc cctgggtggc ggccggcgct gtgcctgcc tgtgagcggc 480
gccccgcagt gggcgccggt gctggacttt gcgcggccgg gcgccttcggc ttacgggtcg 540
ttgggcggcc ccgcgcggcc accggctccg ccgcaccccc cgccgcggcc gcctcaactcc 600
ttcatcaaac aggagccgag ctggggcgag gcggagccgc acgaggagca gtgcctgagc 660
gccttcaactg tccacttttc cggccagttc actggcacag ccggagcctg tcgctacggg 720
cccttcggtc ctccctccgcc cagccaggcg tcatccggcc aggcaggat gtttccataac 780
gcgcctacc tgcccagctg cctcgagagc cagcccgcta ttgcataatca gggttacagc 840
acggtcacct tcgacgggac gcccagctac ggtcacacgc cctcgaccca tgcggcgcag 900
ttccccaaacc actcattcaa gcatgaggat cccatgggcc agcagggttc gctgggttag 960
cagcagtaact cggtgccgccc cccggcttat ggctgccaca ccccaacggc cagctgcacc 1020
ggcagccagg ctttgctgct gaggacgccc tacagcagtg acaatttata ccaaatgaca 1080
tcccagcttg aatgcatgac ctggaatcag atgaacttag gagccacctt aaagggagtt 1140
gctgctggga gctccagctc agtgaaatgg acagaagggc agagcaacca cagcacaggg 1200
tacgagagcg ataaccacac aacgccccatc ctctgcggag cccaaatacag aatacacacg 1260
cacggtgtct tcagaggcat tcaggatgtc cgacgtgtgc ctggagtagc cccgactctt 1320
gtacggtcgg catctgagac cagtgagaaa cgccccttca tgtgtgctta cccaggctgc 1380
aataagagat atttaagct gtcccactta cagatgcaca gcaggaagca cactggtag 1440
aaaccatacc agtgtgactt caaggactgt gaacgaaggt ttctcggttc agaccagctc 1500
aaaagacacc aaaggagaca tacaggtgtg aaaccattcc agtgtaaaac ttgtcagcga 1560
aagttctccc ggtccgacca cctgaagacc cacaccagga ctcatacagg taaaacaagt 1620
gaaaagccct tcagctgtcg gtggccaagt tgtcagaaaa agtttgcgg gtcagatgaa 1680
ttagtcggcc atcacaacat gcatcagaga aacatgacca aactccagct ggcgtttga 1740
gggtctccc tcggggaccc ttcagtggtcc caggcagcac agtgtgtgaa ctgcattcaa 1800

gtctgactct	ccactcctcc	tcactaaaaaa	ggaaacttca	gttgatcttc	ttcatccaac	1860
ttccaagaca	agataccgg	gtttctggaa	actaccagg	gtgcctggaa	gagttgg	1920
ctgccctgcc	tacttttagt	tgactcacag	gccctggaga	agcagcta	aatgtctgg	1980
tagttaaaag	cccattgcca	tttggtgtgg	attttctact	gtaagaagag	ccatagctga	2040
tcatgtcccc	ctgacccttc	ccttcttttt	ttatgctcg	tttcgctggg	gatggaaatta	2100
ttgttaccatt	ttcttatcatg	gaatatttat	aggccagggc	atgtgtatgt	gtctgcta	2160
gtaaactttg	tcatggtttc	catttactaa	cagcaacagc	aagaaataaa	tcagagagca	2220
aggcatacg	ggtaatctt	gtctaacatt	cccgagg	gccaggctgc	taacctggaa	2280
agcaggatgt	agttctgcca	ggcaactttt	aaagctcatg	catttcaagc	agctgaagaa	2340
aaaatcagaa	ctaaccagta	cctctgtata	gaaatctaaa	agaatttac	cattcagtt	2400
attcaatgt	aacactggca	cactgcttt	aagaaactat	gaagatctga	gat	2460
tgtatgttt	tgactctttt	gagtggtaat	catatgtgtc	tttata	gat	2520
cttgcacaaa	tggaggg	ttcattttca	tcactgggag	tgccttagt	gtataaaaac	2580
catgctggta	tatggcttca	agttgtaaaa	atgaaagtga	ctttaaaaga	aaataggg	2640
tggtccagga	tctccactga	taagactgtt	tttaagtaac	ttaaggac	ttgggtctac	2700
aagtataatgt	gaaaaaaatg	agacttactg	ggtgaggaaa	tccattgttt	aaagatgg	2760
gtgtgtgtgt	gtgtgtgtgt	gtgtgtgtt	gtttgtgtt	gtttttt	gggaggaaat	2820
ttattat	ccgttgctt	aaattactgt	gtaaatata	gtctgata	at	2880
ttgacaacta	aaattaggac	tgtataagta	ctagatgcat	cactgggtgt	tgtat	2940
agatattgat	gataaacactt	aaaattgtaa	cctgcatttt	tcactttgct	ctcaatt	3000
gtctattcaa	aaggaaaaaa	aaaaaaaaaa				3030

<210> 4

<211> 21

<212> RNA

<213> Artificial

<220>

<223> An artificially synthesized RNA

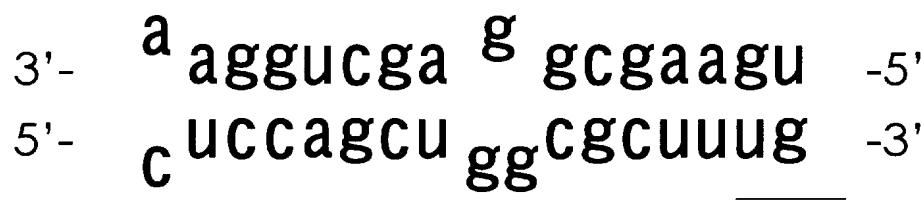
<400> 4

ucgaaaguaau cccgcguacgu u

21

【書類名】 図面
【図 1】

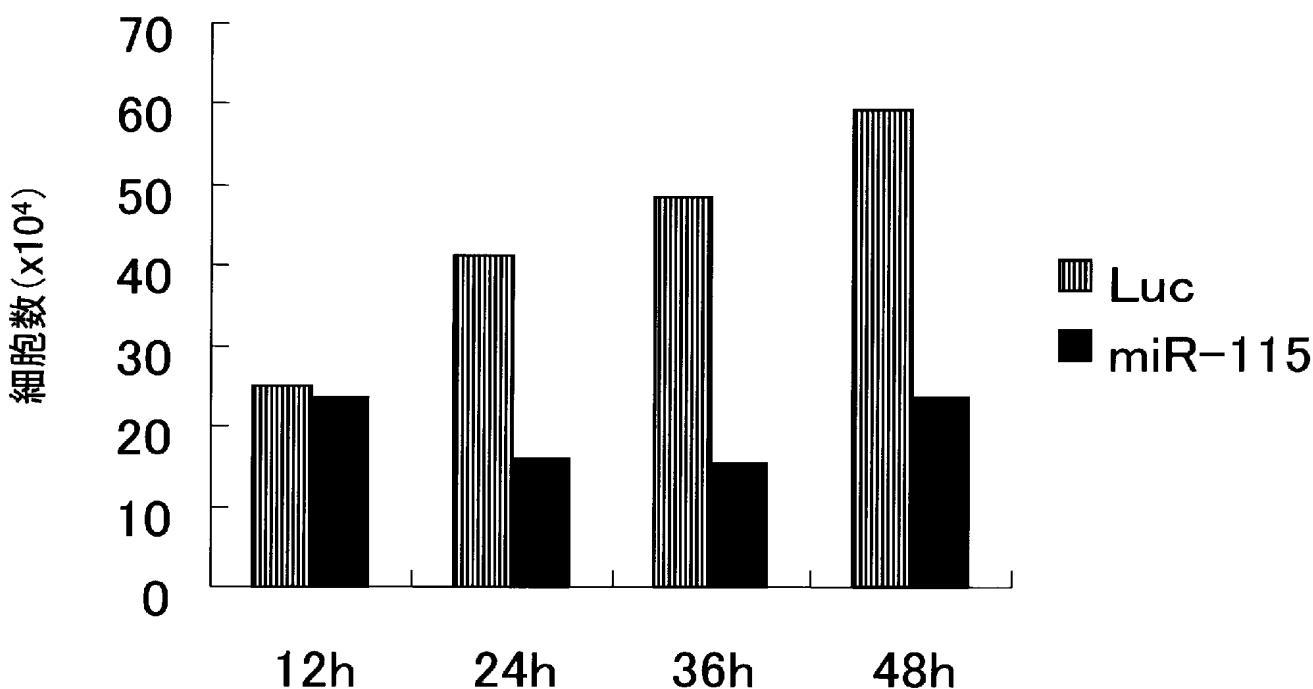
ヒト miR-115



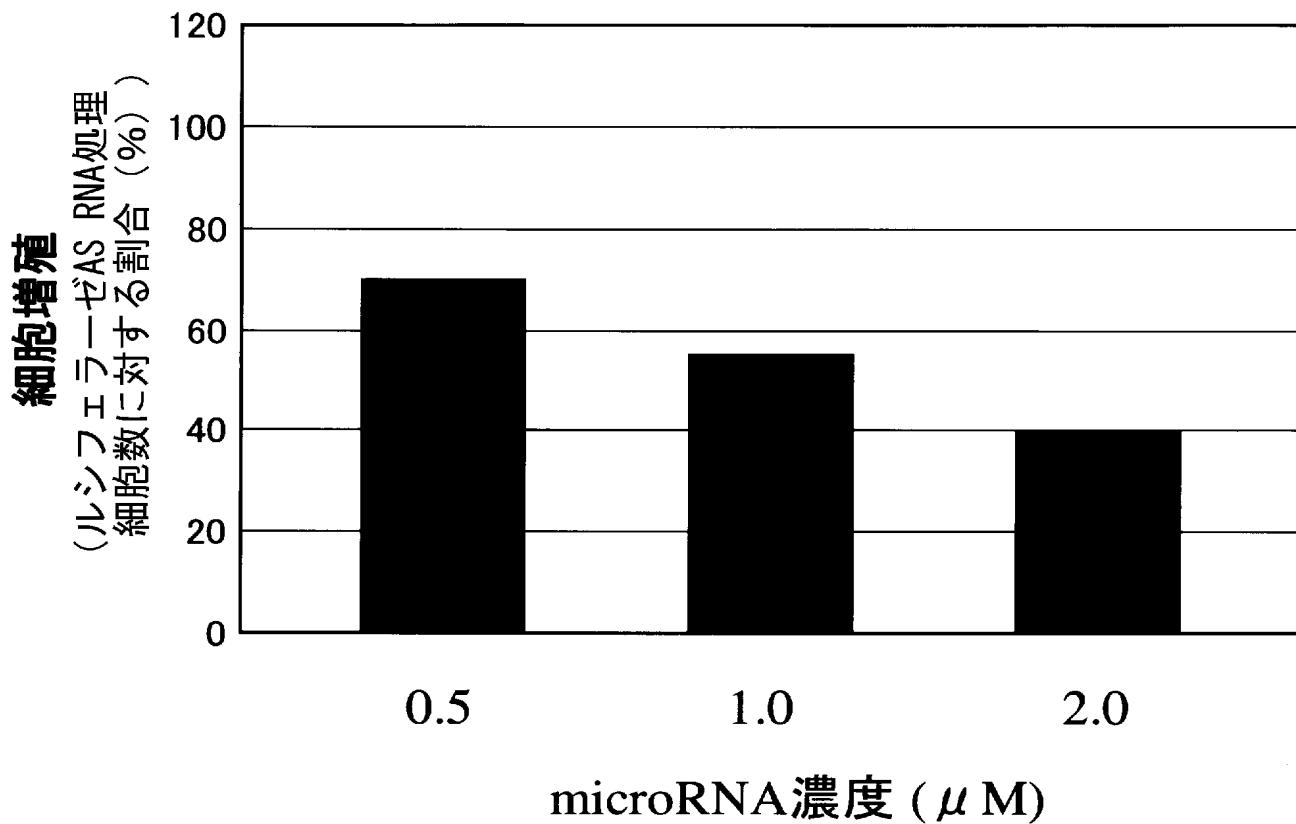
WT1mRNA (1723 nt – 1739 nt) 終止コドン

WT1mRNA (相補性 88%)

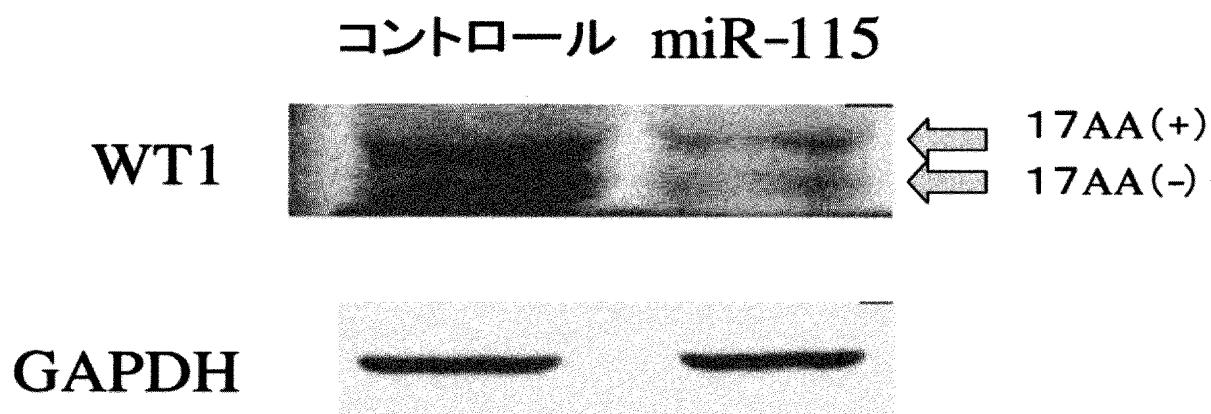
【図 2】



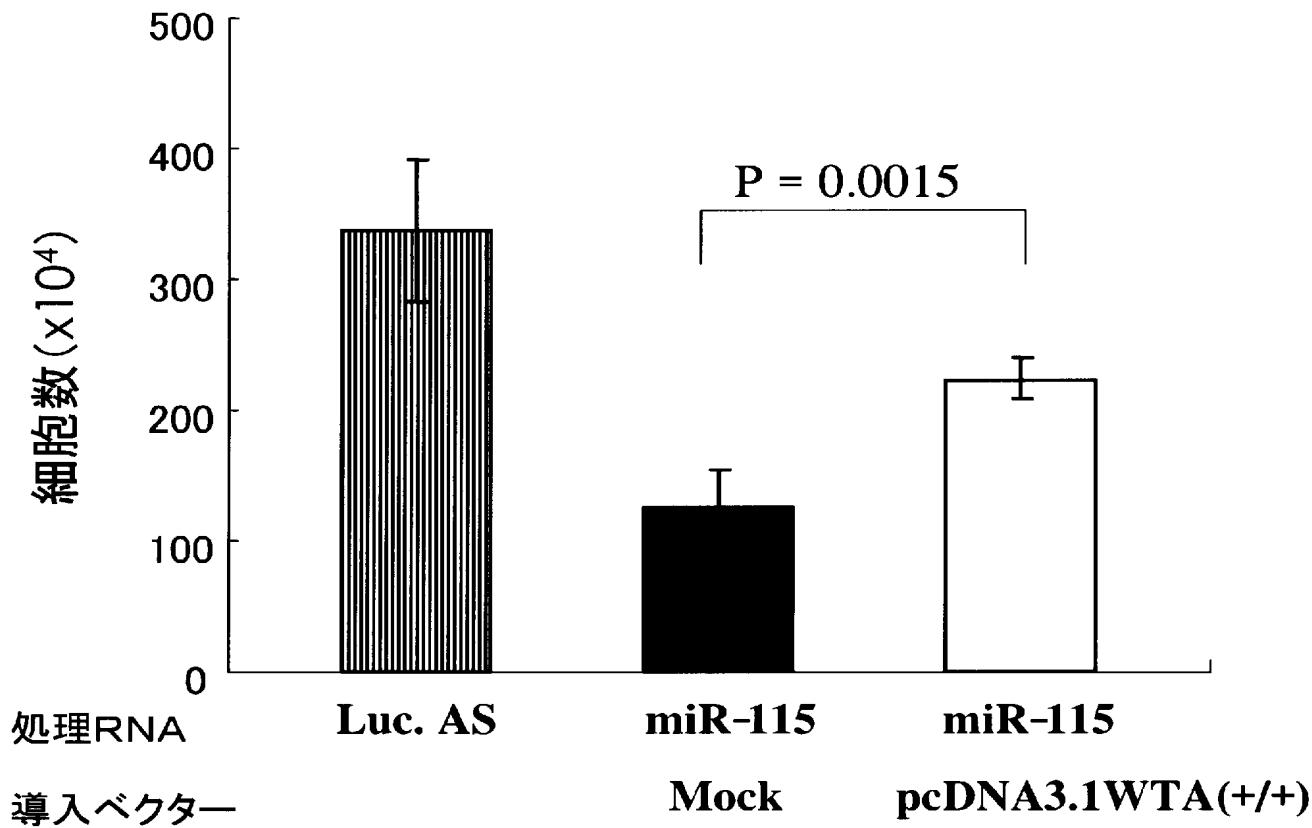
【図 3】



【図 4】



【図 5】



【書類名】要約書

【要約】

【課題】 WT1遺伝子の発現を効率的に抑制することができる分子を提供すると併に、該分子を利用して細胞増殖を抑制することを課題とする。

【解決手段】 WT1遺伝子のストップコドン近傍を標的とするmiRNAがWT1遺伝子の発現を抑制するのみならず、顕著に癌細胞株の細胞増殖抑制効果を示すことを見出した。

【選択図】 なし

出願人履歴

5 9 5 0 9 0 3 9 2

19950601

新規登録

大阪府箕面市船場西 2 - 1 9 - 3 0

杉山 治夫